

Les grains d'amidon géants de l'orchidée *Phajus grandifolius*

Danielle Dupeyre^{a,1}, Henri Chanzy^a, Jean-Luc Putaux^a, Richard Davies^b,
Manfred Burghammer^b, Suzelei Montanari^a, Christian Riekell^b

^a Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, ICMG-CNRS, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9.

^b European Synchrotron Radiation Facility, BP 220, 38043 Grenoble Cedex.

Résumé – La structure et la morphologie des grains d'amidon géants de l'orchidée *Phajus grandifolius* ont été étudiées à l'aide de plusieurs techniques de microscopie photonique et électronique ainsi que par microdiffraction utilisant le rayonnement synchrotron. La plupart des grains sont de forme ogivale et ont des dimensions allant de 50 à 200 μm . Cependant, un petit pourcentage de ces grains possèdent en plus une protubérance trapézoïdale qui se développe orthogonalement à leur surface. L'analyse structurale a permis de déterminer l'orientation locale des molécules d'amylopectine, tant dans les grains ogivaux que dans ceux présentant une protubérance.

1. Introduction

Bien que l'on sache depuis longtemps que l'amidon est semi-cristallin, la détermination de son ultrastructure est un sujet qui ne progresse que lentement du fait de la taille très réduite des grains d'amidon. En effet, l'étude de ces grains par des techniques classiques de diffraction des rayons X se résume en général à l'enregistrement de clichés de poudre dont l'interprétation est difficile, voire impossible. Pour aller plus loin, il est nécessaire de disposer d'une source de rayons X de taille bien inférieure au diamètre des grains d'amidon, de façon à pouvoir enregistrer localement des clichés de diffraction orientés. C'est dans ce contexte que nous avons entrepris une étude morphologique et structurale des grains d'amidon géants de l'orchidée *Phajus grandifolius* qui, à notre connaissance, figurent parmi les grains d'amidon les plus grands connus à ce jour. En plus d'informations morphologiques obtenues par des techniques de microscopie, nous avons établi des cartes de diffraction de grains individuels en les balayant par un micro-faisceau de rayonnement synchrotron. Comme nous le montrons dans cette présentation qui fait suite à une publication récente [1], ces données ont permis de progresser dans la compréhension de l'ultrastructure cristalline de ces grains à la forme si particulière.

2. Partie expérimentale

Des pseudo-bulbes de *P. grandifolius* en provenance du Brésil ont été pulvérisés puis tamisés et lavés par centrifugations successives, de façon à obtenir une suspension de grains d'amidon. Certains grains ont été analysés sans traitement supplémentaire tandis que d'autres ont été partiellement digérés par une préparation d' α -amylase de suc pancréatique de porc. Les grains ont été observés (i) par microscopie électronique à balayage (MEB) en mode électrons secondaires, à l'aide d'un microscope JEOL JEM6100, (ii) par microscopie photonique en lumière polarisée à l'aide d'un microscope Zeiss Axiophot II et (iii) par microscopie confocale à balayage, à l'aide d'un appareil Leica TCs SP2 opérant sous faisceau laser He/Ne, les échantillons ayant été au préalable colorés par la rhodamine.

Des grains individuels en suspension dans une solution aqueuse de polyéthylène glycol ont été pêchés à l'aide d'un anneau de nylon, puis congelés rapidement avant d'être placés dans le faisceau de la ligne ID13 de l'ESRF de Grenoble. La carte de diffraction de ces grains a ensuite été enregistrée à 90 K, à l'aide d'un faisceau de rayons X de 5 μm de diamètre, balayant successivement tout le grain avec un pas de 5 μm .

3. Résultats

La plupart des grains d'amidon de *P. grandifolius* ont une forme allongée et en ogive, avec, d'un côté, une extrémité pointue et de l'autre une extrémité aplatie (Figure 1a-2). La longueur des grains varie de 50 à 200 μm . Un petit pourcentage d'entre eux présentent une protubérance trapézoïdale inhabituelle, perpendiculaire à la surface du grain principal (Figures 1a-1, 1b et 1c). Les anneaux de croissance, correspondant à l'alternance de couches amorphes et semi-cristallines de l'amidon, sont fortement incurvées voire même fermées près de l'extrémité pointue où se situe le hile, point de départ de la synthèse du grain. Par contre, au niveau de l'extrémité aplatie ou de l'excroissance, leur courbure est extrêmement faible (Figures 1b et 1c). La transition entre un grain et sa protubérance laisse penser que cette dernière apparaît à un certain stade du développement. Vue debout, l'extrémité aplatie présente une fente (Figure 1a-2) indiquant que les grains sont sans doute constitués de deux "lobes" résultant d'un mode particulier de biosynthèse. Parmi les anneaux de croissance, les couches amorphes sont les cibles préférentielles de l'attaque enzymatique, ce qui permet de mettre en évidence la morphologie interne des grains, après cryo-broyage dans l'azote liquide.

¹ Auteur à contacter : dupeyre@cermav.cnrs.fr – Tél. : 04 76 03 76 06

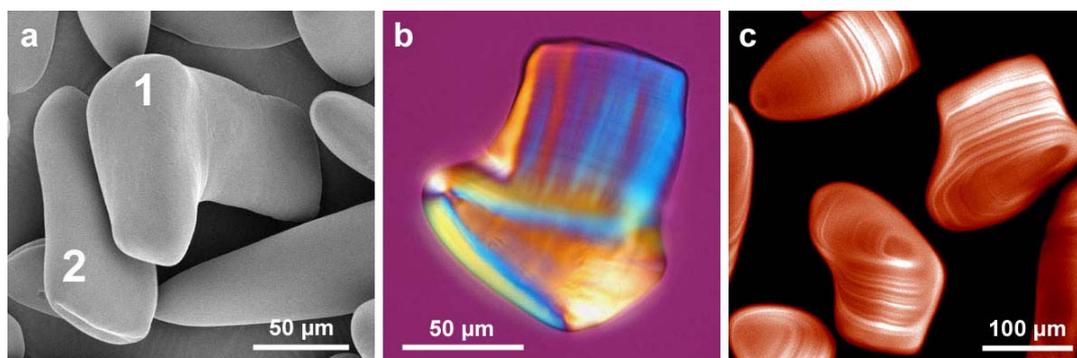


Figure 1 – Grains d'amidon natifs extraits d'un pseudo-bulbe de l'orchidée *P. grandifolius* : a-1) image au MEB d'un grain pourvu d'une excroissance caractéristique ; a-2) grain ogival montrant son extrémité aplatie pourvue d'une fente ; b) image de microscopie photonique en lumière polarisée d'un grain possédant une protubérance. On distingue des striations correspondant aux anneaux de croissance. c) image de microscopie confocale à balayage laser montrant l'organisation des anneaux de croissance à l'intérieur de grains ogivaux ou avec une excroissance.

A la suite des études réalisées sur des grains d'amidon de pomme de terre et de pois lisse [2] et grâce à leur grande taille, des grains individuels de *P. grandifolius* ont été sélectionnés et analysés par micro-diffraction en balayage. La carte de diffraction reconstituée d'un grain ogival, telle que celle présentée Figure 2a, comporte plus de 300 clichés, enregistrés tous les 5 μm (Figure 2b). Dans chaque cliché, seule la réflexion 100 à 1.58 nm, correspondant à la distance inter-hélicale des segments linéaires d'amylopectine cristallisés sous forme B, a été prise en compte pour évaluer l'orientation des molécules d'amylopectine dans les différentes zones du grain (Figure 2c). La cartographie obtenue montre que ces molécules sont uniformément orientées dans un axe allant du hile à l'extrémité opposée. Ainsi, en fonction de la courbure des anneaux de croissance, l'orientation devient de plus en plus parfaite en s'éloignant du hile vers l'extrémité aplatie du grain. Par contre, dans la protubérance, les molécules d'amylopectine prennent une direction perpendiculaire à celles du grain principal. C'est aux extrémités des protubérances que l'orientation des molécules d'amylopectine est également la meilleure. Cette observation avait permis à Kreger d'enregistrer les premiers clichés de diffraction des rayons X orientés de grains d'amidons individuels [3]. Notre étude a confirmé ses observations mais l'utilisation du rayonnement synchrotron a permis d'enregistrer en grand nombre des clichés de diffraction de qualité supérieure.

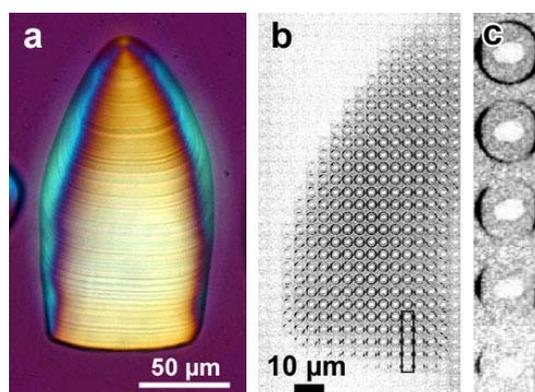


Figure 2 – a) Grain d'amidon de *P. grandifolius* observé par microscopie optique en lumière polarisée ; b) Image composite formée de clichés de microdiffraction des rayons X enregistrés sur la ligne ID13 de l'ESRF en balayant un faisceau de 5 μm de diamètre avec un pas de déplacement de 5 μm ; c) agrandissement de la colonne de 5 clichés de microdiffraction encadrée en b. La résolution de ces clichés est limitée à 1.5 nm.

4. Références

- [1] H. Chanzy, J.L. Putaux, D. Dupeyre, R. Davies, M. Burghammer, S. Montanari et C. Riekkel, *Morphological and structural aspects of the giant starch granules from Phajus grandifolius*, *J. Struct. Biol.* **154** (2006) 100-110
- [2] A. Buléon, B. Pontoire, C. Riekkel, H. Chanzy, W. Helbert et R. Vuong, *Crystalline ultrastructure of starch granules revealed by synchrotron radiation microdiffraction mapping*, *Macromolecules* **30** (1997) 3952-3954.
- [3] D.R. Kreger, *The configuration and packing of the chain molecules of native starch as derived from X-ray diffraction of part of a single starch grain*. *Biochim. Biophys. Acta* **6** (1951) 406-425.